

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลจากการแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากตัวอย่างดินจากหมู่เกาะตะรุเตา จำนวน 40 ตัวอย่าง ตามลำดับ เลี้ยงในอาหาร Glucose Yeast extract Malt agar (GYM) ที่เติมยาปฏิชีวนะ cycloheximide 50 µg/ml และ nalidixic acid 20 µg/ml สามารถแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากหมู่เกาะตะรุเตาทั้งหมด 306 ไอโซเลท เมื่อทำการตรวจนับปริมาณของเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากตัวอย่างต่างๆ บนอาหาร GYM agar ที่เติมยาปฏิชีวนะพบว่าปริมาณเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากเกาะตะรุเตาอยู่ในช่วง $2.0 \times 10^2 - 8.0 \times 10^4$ CFU/g ของดิน เกาะอาดังจำนวนเชื้อสเตรปโตมัยซีทอยู่ในช่วง $2.0 \times 10^3 - 2.6 \times 10^4$ CFU/g ของดิน และเกาะราวีจำนวนเชื้อสเตรปโตมัยซีท อยู่ในช่วง $1.6 \times 10^3 - 4.0 \times 10^4$ CFU/g ของดิน

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 - 21 วัน จึงตรวจดูลักษณะของเส้นใยและสายสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของสายสปอร์ 3 แบบ คือ แบบที่ 1 Rectiflexibles ซึ่งลักษณะของสายสปอร์เป็นแบบปลายตรง (straight) จนถึงคดงอเล็กน้อย (flexuous) จำนวน 188 ไอโซเลท โดยพบที่เกาะอาดัง เกาะราวี และเกาะตะรุเตา จำนวน 33, 54 และ 101 ไอโซเลท ตามลำดับ แบบที่ 2 Retinaculiaperti ลักษณะของสายสปอร์เป็นรูปตะขอ (hook) จนถึงม้วนเป็นห่วง (loop) จำนวน 54 ไอโซเลท และแบบที่ 3 Spirales ลักษณะของสายสปอร์เป็นเกลียว (spiral) สร้างสายสปอร์ทั้งแบบที่ 1 และ 2 สร้างสายสปอร์ทั้งแบบที่ 2 และ 3 สร้างสายสปอร์ทั้ง 3 แบบ ซึ่งจำนวนสปอร์ที่สร้างขึ้นมีตั้งแต่ 5-50 สปอร์ เชื้อสามารถผลิตเม็ดสีได้หลากหลาย การจัดกลุ่มสีที่แพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถแบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ สีน้ำตาล สีเหลือง สีชมพู สีเขียว-ดำ และไม่ผลิตเม็ดสีตามลำดับ ลักษณะสีของสปอร์เชื้อที่แยกได้จากเกาะอาดังเมื่อทำการจัดกลุ่มสีของสปอร์สามารถแบ่งเป็น 8 กลุ่ม คือ สีขาว สีเหลือง สีน้ำตาล สีฟ้า สีเขียว สีดำ สีแดง และสีเทา

การวิเคราะห์หาชนิดของ Diaminopimelic acid (DAP) และชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ ด้วยวิธี Paper Chromatography ของเชื้อสเตรปโตมัยซีทจำนวน 306 ไอโซเลท พบว่าสามารถจัดกลุ่มเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มี DAP เป็นชนิด LL-DAP มี glycine และชนิดของน้ำตาลเป็นแบบ type C มีแบบแผนของน้ำตาลที่ไม่มีรูปแบบตายตัว โดยแบ่งเป็น 30 กลุ่ม จำนวน 289 ไอโซเลท ซึ่งเป็นรูปแบบของกรดอะมิโนที่จัดอยู่ใน Cell wall Type I กลุ่มที่ 2 ชนิด LL-DAP มี glycine และชนิดของน้ำตาลเป็นแบบ type A มีน้ำตาล arabinose, galactose โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม จำนวน 14 ไอโซเลท ซึ่งเป็นรูปแบบของกรดอะมิโนที่จัดอยู่ใน Cell wall Type I และกลุ่มที่ 3 ชนิด meso-DAP มี glycine และชนิดของน้ำตาลเป็นแบบ type A โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม จำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งเป็นรูปแบบของกรดอะมิโนที่จัดอยู่ใน Cell wall Type II

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา การผลิตเม็ดสี และการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อสเตรปโตมัยซีท โดยการจัดความสัมพันธ์ (Similarity) โดยใช้ simple matching coefficient และทำการจัดกลุ่มโดยใช้ unweighted pair group method with arithmetic averages algorithm โดยใช้โปรแกรม NTSYS pc 2.1 นำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติตามหลักการของ numerical taxonomy แสดงผลเป็น dendrogram เกาะอาดังที่ความสัมพันธ์ 83.636% โดยให้ค่า cophenetic correlation เท่ากับ 0.653 มีเชื้อเดี่ยว (single member cluster) 10 ไอโซเลท กลุ่มเชื้อที่มีสมาชิก 2 – 3 ไอโซเลท (minor cluster) จำนวน 13 กลุ่ม (29 ไอโซเลท) และเชื้อที่มีสมาชิก 4 – 6 ไอโซเลท (major cluster) จำนวน 4 กลุ่ม (21 ไอโซเลท) เกาะราวีที่ความสัมพันธ์ 83.715% โดยให้ค่า cophenetic correlation เท่ากับ 0.792 มีเชื้อเดี่ยว (single member cluster) 25 ไอโซเลท กลุ่มเชื้อที่มีสมาชิก 2 – 3 ไอโซเลท (minor cluster) จำนวน 7 กลุ่ม (16 ไอโซเลท) และเชื้อที่มีสมาชิก 4 – 12 ไอโซเลท (major cluster) จำนวน 9 กลุ่ม (57 ไอโซเลท) เกาะตะรุเตาที่ความสัมพันธ์ 83.466% โดยให้ค่า cophenetic correlation เท่ากับ 0.641 มีเชื้อเดี่ยว (single member cluster) 15 ไอโซเลท กลุ่มเชื้อที่มีสมาชิก 2 – 3 ไอโซเลท (minor cluster) จำนวน 12 กลุ่ม (30 ไอโซเลท) และเชื้อที่มีสมาชิก 4 – 16 ไอโซเลท (major cluster) จำนวน 12 กลุ่ม (103 ไอโซเลท)

ผลจาก numerical taxonomy และ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rDNA ของเชื้อจากเกาะอาดังมาเทียบเคียงกัน พบว่า เชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อจากเกาะอาดังมีทั้งหมด 13 สายพันธุ์ ได้แก่ *Kitasatospora sampliensis* VT-36^T, *Streptomyces alanosinicus* NBRC 13493^T, *Streptomyces avellaneus* NBRC 13451^T, *Streptomyces cavourensis* NBRC 13026^T, *Streptomyces durhamensis*

NRRL B-3309^T, *Streptomyces gelaticus* NRRL B-2928^T, *Streptomyces griseoluteus* NBRC 13375^T, *Streptomyces griseoruber* NBRC 12873^T, *Streptomyces lucensis* NBRC 13056^T, *Streptomyces malaysiensis* NBRC 16446^T, *Streptomyces misionensis* NBRC 13063^T, *Streptomyces niveiscabiei* S78^T และ *Streptomyces violascens* ISP 5183^T

เชื้อที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อจากเกาะราวีมีทั้งหมด 16 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptomyces avellaneus* NBRC 13451^T, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi* NBRC 12748^T, *Streptomyces chromofuscus* NBRC 12851^T, *Streptomyces djakartensis* NBRC 15409^T, *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773^T, *Streptomyces echinatus* NBRC 12763^T, *Streptomyces flavidovirens* IFO 13039^T, *Streptomyces gelaticus* NRRL B-2928^T, *Streptomyces laurentii* LMG 19959^T, *Streptomyces malachitospinus* NBRC 101004^T, *Streptomyces parvulus* NBRC 13193^T, *Streptomyces sanglieri* NBRC 100784^T, *Streptomyces sporocinereus* NBRC 100766^T, *Streptomyces violaceorubidus* LMG 20319^T, *Streptomyces violascens* ISP 5183^T และ *Streptomyces yatensis* NBRC 101000^T

เชื้อที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อจากเกาะตะรุเตามีทั้งหมด 15 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptomyces avellaneus* NBRC 13451^T, *Streptomyces chartreusis* NBRC 12753^T, *Streptomyces chromofuscus* NBRC 12851^T, *Streptomyces flavidovirens* IFO 13039^T, *Streptomyces griseoluteus* NBRC 13375^T, *Streptomyces griseoflavus* LMG 19344^T, *Streptomyces graminearus* NBRC 15420^T, *Streptomyces malachitospinus* NBRC 101004^T, *Streptomyces purpureus* NRRL B-5403^T, *Streptomyces parvulus* NBRC 13193^T, *Streptomyces carpinensis* NBRC 14214^T, *Streptomyces sporocinereus* NBRC 100766^T, *Streptomyces violascens* ISP 5183^T, *Streptomyces hyderabadensis* OU-40^T และ *Streptomyces yatensis* NBRC 101000^T

ข้อเสนอแนะ

การแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจำเป็นต้องบ่มเชื้อเป็นเวลานาน จึงต้องใช้ความระมัดระวังในเรื่องการปนเปื้อนทั้งจากแบคทีเรีย รา มดหรือแมลง ซึ่งมีผลทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อได้ และจะส่งผลให้ข้อมูลความหลากหลายของเชื้อสเตรปโตมัยซีทในตัวอย่างนั้นผิดพลาดได้

การจัดจำแนกเชื้อสเตรปโตมัยซีทถ้าต้องการจัดจำแนกให้ถึงระดับสปีชีส์ จำเป็นที่จะต้องมีการทำ 16S rDNA sequence

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดในการทดสอบเนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดต้องการสารอาหารและสภาพแวดล้อมในการสร้างสารปฏิชีวนะแตกต่างกัน และมีการทดสอบในลักษณะ Sensitivity test

การตรวจสอบลักษณะของสายสปอร์โดยเทคนิค Slide culture มีจุดดีคือ สามารถสังเกตลักษณะของสายสปอร์ได้อย่างชัดเจนและถูกต้อง เนื่องจากสปอร์ไม่หลุดแตกออกจากกัน แต่ในขณะเดียวกันสิ่งที่ควรพึงระวังได้แก่ (1) การปนเปื้อนของเชื้อราอื่นในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เพราะอาจทำให้เกิดความผิดพลาดและสับสนในการตรวจสอบ (2) ความหนาของอาหารที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากชั้นวันที่หนาเกินไปจะมีผลต่อการปรับระยะโฟกัส หรือการปรับภาพให้ชัดเจน เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การสกัด genomic DNA ของเชื้อสเตรปโตมัยซีทเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR เมื่อใช้อาหารเหลวชนิดที่มีส่วนประกอบของสารอาหารมาก เช่น GYM สามารถทำให้เชื้อสเตรปโตมัยซีทเจริญเพิ่มปริมาณได้มากและรวดเร็ว แต่การนำเซลล์ของเชื้อมาสกัดดีเอ็นเอปรากฏว่าเชื้อมีการผลิตเมือกออกมามากทำให้เป็นปัญหาในการสกัดดีเอ็นเอ ในขณะที่ใช้อาหารเหลว GYE ให้ปริมาณเซลล์น้อยกว่า และใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อมากกว่า แต่การผลิตเมือกของเชื้อมีน้อย จึงมีความเหมาะสมในการนำไปเลี้ยงเชื้อสเตรปโตมัยซีทเพื่อสกัดดีเอ็นเอ แต่เนื่องจากเชื้อบางไอโซเลทสามารถผลิตตรงควัดลงในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งมีผลต่อปฏิกิริยา PCR จึงควรล้างเซลล์ของเชื้อให้สะอาดก่อนจนกว่าจะควัดและอาหารเลี้ยงเชื้อจะหมดไป